

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, A61K 48/00, 31/70, C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO00/09684 (43) 国際公開日 2000年2月24日(24.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04399 (22) 国際出願日 1999年8月13日(13.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/242596 1998年8月14日(14.08.98) JP 特願平10/333284 1998年11月24日(24.11.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 横山茂之(YOKOYAMA, Shigeyuki)[JP/JP] 〒113-0023 東京都文京区向丘1-20-6-607 Tokyo, (JP) 平尾一郎(HIRAO, Ichiro)[JP/JP] 〒351-0036 埼玉県朝霞市北原2-7-9-403 Saitama, (JP) 坂本健作(SAKAMOTO, Kensaku)[JP/JP] 〒120-0044 東京都足立区千住緑町2-10-15-803 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書 補正書
(54)Title: NUCLEIC ACID CAPABLE OF BINDING SPECIFICALLY TO Ras TARGET PROTEIN (54)発明の名称 Rasの標的蛋白質に特異的に結合し得る核酸 (57) Abstract A novel nucleic acid (aptamer) which binds specifically to the target protein of Ras, more particularly, a novel RNA aptamer which binds specifically to Raf-1; a method for screening an RNA capable of binding specifically to the target protein of Ras which comprises selecting an RNA capable of binding to the target protein of Ras from a pool of RNAs having various base sequences; a method for regulating the transmission of a signal causing the proliferation or differentiation of cells by using the above-described nucleic acid; and medicinal compositions with the use of the same.		

本発明は、R a s の標的蛋白質に特異的に結合する新規な核酸⁷(アプタマー)に関する。より詳細には、本発明は、R a f - 1 に特異的に結合する新規な R N A アプタマーに関する。また、本発明は、種々の塩基配列を有する R N A のプールから、R a s の標的蛋白質への結合能を有する R N A をセレクションすることからなる、R a s の標的蛋白質への特異的な結合能を有する R N A を選別する方法に関する。さらに、本発明は、本発明の核酸を使用する細胞の増殖や分化をひき起こすシグナル伝達の制御方法、及び、これを用いた医薬組成物に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	RSD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GD	グレナダ	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GE	グルジア	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GH	ガーナ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ガンビア	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	CN	ギニア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MD	モルドヴァ	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
CA	カナダ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UG	ウクライナ
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	US	ウガンダ
CH	スイス	IN	インド	MW	マラウイ	UZ	米国
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	MX	メキシコ	VN	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IT	イタリア	NE	ニジェール	YU	ウイェトナム
CN	中国	JP	日本	NL	オランダ	ZA	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZW	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド		ジンバブエ
CY	キプロス	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

R a s の標的蛋白質に特異的に結合し得る核酸

技術分野

本発明は、R a s の標的蛋白質に特異的に結合する新規な核酸（アプタマー）に関する。より好ましくは、本発明は、R a f - 1 に特異的に結合する新規な R N A アプタマーに関する。また、本発明は、本発明の核酸を使用する細胞の増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御、及び、これを用いた医薬組成物に関する。

背景技術

R a s はグアニンヌクレオチド結合蛋白質であり、細胞のシグナル伝達に関与している。細胞のレセプターが活性化されると、細胞内の「G D P 結合型 R a s」が「G T P 結合型 R a s」となる。

この「G T P 結合型 R a s」が、R a f - 1、B - R a f、R G L、R a 1 G D S、M E K K、P 1 3 Kなどの「R a s の標的蛋白質」に結合する。これらの「R a s の標的蛋白質」には、G T P 結合型 R a s が結合し得る R a s 結合ドメイン（R B D）があり、G T P 結合型 R a s はこれらの「R a s の標的蛋白質」のこのドメインに結合して、必要なシグナルを細胞内に伝達してゆく。

このように R a s は、細胞内のシグナル伝達のキーとなる蛋白質であり、R a f - 1 などの「R a s の標的蛋白質」は、R a s からのシグナルをその種類に応じて伝達してゆく細胞内シグナル伝達系の中核となるものである。

したがって、「R a s の標的蛋白質」における G T P 結合型 R a s との結合ドメインを特異的にブロックし得る物質があれば、細胞内の R a s によるシグナル伝達系を特異的に阻害することが可能となり、当該シグナル伝達に起因する各種疾患の治療や予防に有用になる。例えば、がん細胞においては、「R a s の標的蛋白質」による増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御を特異的に阻害する

ことより、がん細胞の増殖や分化を停止させて、がんの治療や転移を防止することができるようになる。

ところで、「R a s の標的蛋白質」のひとつである R a f - 1 は、細胞質に存在するセリン／スレオニンプロテインキナーゼであり、G T P 結合型 R a s と相互作用することにより活性が誘導される。活性化された R a f - 1 は、M E K (M A P K / E R K kinase) をリン酸化する。そしてこの M E K が E R K をリン酸化することにより、核内にシグナルが伝達される (Daum, G., et al., (1994) Trends Biochem. Sci. 19,474-480. ; Avruch, J., et al., (1994) Trends Biochem. Sci. 19,279-283.)。

このような R a f - 1 の細胞内のシグナル伝達系を解明するために、R a s 又は R a f - 1 の機能を選択的に阻害する方法が利用されてきた (deVries-Smits, A.M., et al., (1992) Nature 357, 602-604.)。これらの研究には、キナーゼ活性を有しない R a f - 1 変異体による R a s 機能の阻害 (Kolch, W., et al., (1991) Nature 349, 426-428.) や、R a f - 1 のキナーゼドメインに結合する抗体による R a f - 1 キナーゼの阻害 (Kolch, W., et al., (1996) Oncogene 13, 1305-1314.) などが含まれている。

しかしながら、これらの阻害作用は、R a s や R a f - 1 によるシグナル伝達系の特定の一部を特異的に阻害するものではなく、R a s との結合機能やキナーゼ機能などの多数の機能を同時に多面的に阻害することから、阻害されるシグナル伝達系を特定することはできず、シグナル伝達系の個々の特定のメカニズムを十分に解明することはできなかった。

したがって、R a f - 1 への R a s の結合を特異的に阻害し得る分子種の開発が、シグナル伝達系の役割を解明してゆくために重要となってきた。

現在のところ、R a s の下流のシグナル伝達経路は完全には解明されてはいないが、このような分子種が開発されれば、特定の一部の経路を特異的に阻害することができる分子種を用いることによって、R a s が関わるシグナル伝達の経路を解明し、R a s の標的蛋白質によるシグナル伝達経路を詳細に解明することができるばかりでなく、細胞内でのシグナルの伝達を制御することができることになり、腫瘍などの細胞内のシグナル伝達に関与している各種疾患の治療、予防が

可能となる。

一方、このような R a s が関わる細胞内のシグナル伝達の経路の中の「R a s の標的蛋白質」の構造解析も行われてきており、そのひとつである R a f - 1 の R a s 結合ドメイン (R B D) は、R a f - 1 の N 末端からの 51 - 131 位であることが知られてきている (Vojtek, A.B., et al., (1993) Cell 74, 205-214. ; Chuang, E., et al., (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 5318-5325.)。

また、非核酸分子種に結合する蛋白質などのある種のターゲットに対して、高親和性を有する R N A 又は D N A などの核酸分子種 (アプタマー類) が、「インビトロセレクション」 (in vitro selection) 法 (Ellington, A.D. et al., (1990) Nature 346, 818-822. ; Tuerk, C. et al., (1990) Science 249, 505-510.) により単離されてきている (Bock, L.C., et al., (1992) Nature 355, 564-566. ; Qiu Qiu, Y.L., et al., (1994) Nucleic Acids Res. 22, 5229-5234. ; Gal, S.W., et al., (1998) Eur. J. Biochem. 252, 553-562. ; Bell, S.D., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 14309-14314.)。したがって、R N A との相互作用が知られていない R a f - 1 に対して、この手法を用いることにより特異的に R a f - 1 に結合する R N A が得られる可能性もある。

発明の開示

本発明は、R a f - 1、B - R a f、R G L、R a l G D S、M E K K、P 13 K などの「R a s の標的蛋白質」の R a s 結合ドメイン (R B D) に特異的に結合して、「G T P 結合型 R a s」との結合を特異的に阻害することができる核酸分子種を提供するものである。

R a s の標的蛋白質が関与するシグナル伝達の経路の解明およびシグナル伝達の阻害がもたらす生理作用を解明するためには、R a s の標的蛋白質、より詳細には R a f - 1 に特異的に結合することにより、R a f - 1 と特に細胞内で重要な役割をになう R a s との結合を特異的に阻害し、かつ強力な作用を有する物質の開発が求められている。本発明者らは、インビトロセレクション (In vitro selection) 法を用いることにより、「R a s の標的蛋白質」の R a s 結合ドメインに特異的に結合する核酸分子種を得ることができることを見出した。例えば、

この手法により「R a sの標的蛋白質」のひとつである R a f -1 の R a s 結合ドメイン (R B D) をターゲットとした新規な R N A アプタマーを得、その R N A 配列を決定することができた。この R N A アプタマーは、R a s と R a f -1 の結合を特異的に阻害することができる。

したがって、本発明は、「R a sの標的蛋白質」、特にその R a s 結合ドメイン (R B D) に特異的に結合する新規な核酸分子種、当該核酸分子種を用いたシグナル伝達系の制御剤、その制御方法、及び、それを含有してなる医薬組成物を提供するものである。

より詳細には、本発明は、「R a sの標的蛋白質」、特にその R B D に特異的に結合する新規な R N A アプタマー、および、当該 R N A アプタマーを用いたシグナル伝達系の制御剤、その制御方法、及び、それを含有してなる医薬組成物を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のインビトロセレクションにおける当初の R N A の配列と P C R プライマーの配列を示すものである。

第2図は、21回の処理における R N A プールから得られた24種の R N A の配列を示す。図中では、ランダム約60塩基の配列部分を示している。全体の配列は、第1図で定義されている5' - 及び3' - 末端の配列を含んでいる。クローン1と同種の配列となっているものを「グループ1」としている。他のものを「グループ2」としている。なお、注(a)は各々の単離されたりガンドのクローンの数をカッコ内に示しており、注(b)はクローン21.08は、各々に定義された配列にそれぞれ2つの変異を有しているものであり、注(c)の R N A リガンドの G S T - R B D への結合のパーセントは、ニトロセルロースフィルター結合アッセイにより測定した値に基づいている。

第3図は、R N A リガンドの G S T - R B D 蛋白質への結合を示す。R N A リガンドの G S T - R B D への結合のパーセントは、ニトロセルロースフィルター結合アッセイにより測定した値に基づいている。第3図中の黒丸印は配列番号1の R N A を、黒四角印は配列番号7の R N A を、黒三角印は配列番号11の R N

Aを用いたものである。

第4図は、RNAアプタマーによる、R a sとG S T-R B Dとの相互作用の阻害を示す図面に代わる写真である。抗R a s抗体R A S 0 0 4によるイミュブロットニングより測定した、G S T-R B Dに結合したR a s蛋白質の量を上段に示す。クマシーブルーでの染色によるG S T-R B Dの量を下段に示す。G D P結合型(D)又はG T P γ S結合型(T)の2 p m o lのR a s、及び、2 5 p m o lのG S T-R B Dを、種々の量のRNAの存在下にインキュベートした。Aは第2図の2 1. 0 1リガンド、Bは第2図の2 1. 0 7リガンド、Cは第2図の2 1. 1 1リガンド、Dは第2図の2 1. 1 2リガンドを使用した。

発明を実施するための最良の形態

本発明の「R a sの標的蛋白質」とは、細胞のシグナル伝達に参与しているR a s蛋白質、好ましくはG T P結合型R a s蛋白質と結合して細胞内のシグナル伝達系を形成する一群の蛋白質をいう。本発明の「R a sの標的蛋白質」としては、例えば、R a f-1、B-R a f、R G L、R a l G D S、M E K K、P 1 3 Kなどが挙げられるがこれに限定されるものではない。本発明の好ましい「R a sの標的蛋白質」としてはR a f-1などが挙げられる。

本発明は、前記した「R a sの標的蛋白質」に特異的に結合し得る核酸分子種が存在することを明らかにしたものであり、したがって、本発明の「R a sの標的蛋白質」と特異的に結合する核酸としては、RNAであってもDNAであってもよく、これらのRNA又はDNAが「R a sの標的蛋白質」に特異的に結合するものであれば特に制限はない。また、本発明の核酸は、ひとつの「R a sの標的蛋白質」にのみ特異的に結合するものであってもよいが、2種以上の「R a sの標的蛋白質」に特異的に結合するものであってもよい。

本発明の核酸分子種の塩基の長さは、「R a sの標的蛋白質」に特異的に結合できるに十分な長さを有するものであれば特に制限はないが、20～300塩基、好ましくは20～150塩基、より好ましくは30～150塩基、さらに好ましくは50～150塩基のものがよい。結合の特異性を強調する場合には、長いものが好ましいが、合成方法などの入手手段の簡便性からは短いものが好ましい。

本発明の核酸分子種を例示すれば、配列表の配列番号 1 ～ 28、好ましくは配列番号 1 ～ 8 又は配列番号 25 ～ 28 のいずれかひとつの塩基配列を含有してなる RNA が挙げられる。

本発明の前記配列番号で示される RNA は、「Ras の標的蛋白質」への結合能を有するものであり、より詳細には Raf-1 の Ras 結合ドメイン (RBD) に特異的に結合することを特徴とするものであり、本発明の核酸分子種は前記した配列番号 1 ～ 28 で示される塩基配列に限定されるものではなく、「Ras の標的蛋白質」への結合能を有するものであれば、配列表の前記配列番号 1 ～ 28 のいずれかひとつの塩基又は 1 個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／又は他の塩基が付加されてなる塩基配列を有するものであってもよい。

本発明の核酸分子種は、これらの塩基配列を分子の全部又は一部において含有するものであればよく、例えば、配列表の配列番号 1 ～ 28 に示される塩基配列を有する核酸分子種に「Ras の標的蛋白質」への結合能を阻害しない範囲においてさらに塩基配列や他の分子種が付加されていてもよい。

本発明のこれらの RNA は、必要により逆転写して、前記した RNA と相補的な塩基配列を有する DNA とすることもできる。したがって、本発明は、配列表の配列番号 1 ～ 28 のいずれかひとつの塩基配列、又は、そのうちの 1 個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／若しくは 1 個以上の塩基が付加されてなる塩基配列を含有する RNA 又は DNA などの核酸分子種に関する。

本発明における「アプタマー」とは、蛋白質の特定のドメインに結合し得る核酸分子種のことをいい、当該核酸としては RNA でも DNA でもよい。RNA からなるアプタマーを「RNA アプタマー」という。したがって、本発明においては、本発明における核酸分子種のことを「アプタマー」とも称し、当該核酸が RNA である場合には「RNA アプタマー」という。

なお、配列表の配列番号 29 ～ 52 で示される約 60 塩基からなる RNA は、配列番号 1 ～ 24 で示される RNA の中心部の約 60 塩基からなる塩基配列を示したものである。また、配列表の配列番号 53 及び 54 で示される約 45 塩基からなる RNA は、配列番号 25 ～ 28 で示される RNA の中心部の 45 塩基からなる塩基配列を示したものである。さらに、配列表の配列番号 55 ～ 60 は、本

発明の具体例において使用されたプライマーの塩基配列を例示したものである。

本発明の核酸（アプタマー）は、種々の方法で製造することができる。アプタマーの塩基配列がわかっている場合には、これを合成することもできる。

本発明のアプタマーの配列がわからない場合には、公知の「インビトロセクション」（*in vitro selection*）法（Ellington, A.D. et al., (1990) *Nature* 346, 818-822. ; Tuerk, C. et al., (1990) *Science* 249, 505-510.）によりアプタマーを選別して与えることができる。本発明における「インビトロセクション」法を説明する。

まず、20～300塩基、好ましくは30～100塩基、より好ましくは30～70塩基のランダムな塩基配列のRNA類を調製する。これらのRNAはランダムな配列を含む合成DNAからの転写反応によって調製される。

このランダムな配列を有するDNA類の5'端及び3'端に、PCR法におけるプライマーとなるべき塩基配列をつける。この場合のプライマーとしては、特に制限はないが、後にこのプライマー部分を切断できるように制限酵素による切断配列を有するものが好ましい。プライマーとなる部分の長さにも特に制限はないが、約20～50塩基、好ましくは20～30塩基程度である。さらに、5'端のプライマーには、T7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を加えて、DNAからRNAへの転写反応が可能となるように設計してもよい。

このようにして両端にプライマーとしての塩基配列を有し、中央部にランダムな塩基配列を有するRNA群（RNAプール）をDNAから転写反応によって調製する。

次いで、このRNAプール中のRNAと、「Rasの標的蛋白質」、例えば、Raf-1、又は、その結合ドメインからなるペプチドを接触させて、「Rasの標的蛋白質」に結合するRNAを分離する。得られたRNAを逆転写してcDNAとし、前記のプライマーを用いてPCR法により増幅する。増幅されたDNAを転写してRNAとし、これを前記したRNAプールへ戻す。

以上の、RNAプール中での「Rasの標的蛋白質」との接触、結合したRNAの分離、逆転写、PCR法による増幅、及び、増幅されたRNAの元のRNAプールへの注入からなるサイクルを「ラウンド」と称する。即ち、1ラウンドと

は前記のラウンドを1回行うことをいう。

RNAプールを用いた前記したラウンドを行うと、RNAプール中の「Rasの標的蛋白質」に結合するRNAの量が増加し、しかも特異的に結合する塩基配列を有するRNAの量が増加してくるので、ラウンド繰り返し行うことによりより特異的に結合するRNAを選別することができるようになる。

このようなラウンドは、5～50ラウンド、好ましくは5～30ラウンド行われる。

前記してきた「インビトロセレクション」法により選別されてきたRNAは、常法によりその塩基配列を決定し、常法により逆転写してcDNAとすることもできる。また、必要により前記したプライマーとして使用された部分を切断することもできる。このようにして、本発明のアプタマーを得ることもできる。

本発明の「インビトロセレクション」法を、「Rasの標的蛋白質」としてRaf-1を例にしてさらに詳細に詳細に説明する。

本発明者らは、Raf-1のRas結合ドメイン(RBD)に結合するRNA類を選定するために、ランダムな約60塩基からなるRNAのプールを用意した。そして、これらの約60塩基からなるRNAの3'-末端及び5'-末端には第1図に示される塩基配列を結合させた。このRNAプールには、約 8×10^{13} 種のRNAが存在していると推定された。

アプタマーのセレクションを行う前に、このRNAプールとRaf-1-RBDの結合に対する塩濃度の効果を調べた。低塩濃度下ではRNAがRaf-1-RBDに非特異的に結合してしまっていたが、塩濃度を高くすることによって(150 mM程度まで)、この非特異的な結合が抑えられることがわかった。そこで、本発明者らは、セレクションのための緩衝溶液として、137 mMの食塩を含むリン酸緩衝液(以下、「結合バッファー」という。)を使用することにした。

最初から13ラウンドまでのセレクションは、グルタチオン-セファロース4Bマトリックスを用いて、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)とRaf-1の51～131までのペプチド(RBD)との融合蛋白質(以下、「GST-RBD」という。)とRNA類との結合により行われた。この13ラウンドで、RNAプールとの結合能(binding ratio)は、当初の0.16%か

ら 0.36% にわずかに上昇した。

これに引き続いて、前記のマトリックスに代えてニトロセルロースフィルターを用いたセレクションを 8 回（8 ラウンド）行った。21 回目のラウンドにおいて、RNA プールの結合能は 22% を示し、蛋白質 GST-RBD に対するプールの K_d 値は 290 nM となった。

21 ラウンドを終えた RNA プールから 33 個のクローンの配列を決定した。その結果、24 種類の異なる配列が得られた。この 24 種のクローンの約 60 塩基の部分の配列を第 2 図に示す。大別して、その配列同士に高いホモロジーを有するクローン（このグループを「グループ 1」という。）とその他の互いにホモロジーが認められないクローン（これらを「グループ 2」とする。）に分けられた。

グループ 1 の 8 種類の RNA（第 2 図の 21.01～21.08）の全長（約 100 塩基）の配列を配列番号 1～8 に示す。

これらのうちの 10 種の RNA と GST-RBD との相互作用を、ニトロセルロースフィルターを用いた結合アッセイにより検討した。その結果を第 2 図の右欄に RNA 結合（%）として示した。この結果、グループ 1 の RNA は GST-RBD と十分な結合を示したのに対して、グループ 2 の RNA は十分な結合を示さなかった。配列番号 1（第 2 図の 21.01）及び配列番号 7（第 2 図の 21.07）に示される RNA の K_d 値は両者共 300 nM であったのに対して、配列番号 11（第 2 図の 21.11）の RNA のそれはマイクロモル単位であった（第 3 図参照）。第 3 図は、配列番号 1（黒丸印）、7（黒四角印）、及び、11（黒三角印）の RNA を種々の濃度（nM）で使用した場合の GST-RBD への結合のパーセントを示している。

さらに、これらの RNA リガンドは、GST それ自身には結合しなかった。このことは、これらの RNA は GST 部分よりも GST-RBD の RBD 部分に結合するものであることを示している。

次に、前記のグループ 1 の RNA アプタマーが Ras と RBD の相互作用を阻害するか否かを検討した（第 4 図参照）。配列番号 1（第 4 図の A）、7（第 4 図の B）、11（第 4 図の C）、及び 12（第 4 図の D）（それぞれ第 2 図中の

21.01、21.07、21.11及び21.12に対応する。)の各々のRNAを0から12.5 μ Mの濃度で試験した。セファロースマトリックスに担持されたGST-RBDと、GTP γ S又はGDP中のRasと共にインキュベートした。これらのRNAが存在する場合(第4図中の各レーン3、4及び5。レーン3はRNA 20 pmol、レーン4はRNA 200 pmol、レーン5はRNA 2000 pmol。)とRNAが存在しない場合(第4図中の各レーン1及び2。レーン1はGDPの存在下で、レーン2~5はGTP存在下である。)における、GST-RBDとRasとの結合を抗Ras抗体RAS004による免疫ブロッティングにより検出した。

第4図中の「Ras」は、RasとGST-RBDの結合したものを示し、「GST-RBD」はGST-RBDが単独で存在していることをバックグラウンドとして示している。前述したようにGST-RBDとほとんど結合しない配列番号12(第4図のD)のRNAは、濃度を12.5 μ MしてもGST-RBDへのRasの結合を阻害しなかった。kd値がマイクロモル単位であった配列番号11(第4図のC)のRNAも同様であった。

これに対して、グループ1の中の配列番号1(第4図のA)及び7(第4図のB)のRNAは、RasとRBDの相互作用を効果的に阻害した。このことは、これらのRNAがRBDへ結合したためと考えられる。そして、GTP結合型のRasとRaf-1のRBDとのkd値は18 nM(Hermann, C., et al., J. Biol. Chem., 270, 2901-2905 (1995))であり、配列番号1及び7のRNAはその10倍も結合能が低いにもかかわらず、これらのRNAはRasとRaf-1との相互作用を阻害する。

これらのRNAは、Rasやセファロースマトリックスに対しては親和性を有していないのであるから、これらのRNAがRasやセファロースマトリックスに結合して、マトリックス上のGST-RBDとRasとの結合を阻害するという可能性はない。以上のことから、これらのRNAアプタマーのRBDに対する特異性が示された。

同様な方法を、5'末端に5'- ggtaa tacga ctcac tatag ggagt ggagg aattc atcga ggcat -3'、3'末端に5'- catat gcctt agcga cagca agctt ctgc -3'の配

列を有し、その中間にランダムな45塩基を含む一本鎖DNAプール（200 pmol、 1.2×10^{14} 分子）を合成し、この一本鎖DNAのプールを、PCRで二本鎖のDNAのプールを用いて行った。

この結果、Raf-1RBDに結合する新規なRNAアタマーを得ることができた。これらの配列は以下の通りであり、配列表の配列番号25～28に示す。

配列 2 5

```
gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa    60
auugguuuua gcauugccu uagcgacagc aagcuucgc                                100
```

配列 2 6

```
gggaguggag gaauucaucg aggcaugacc ucccguggca guagggguua aaauuauuu    60
ccuacacuuc ucaugccuua gcgacagcaa gcuucgc                                98
```

配列 2 7

```
gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa    60
auugguuuua gcauugccu uagcgacagc                                90
```

配列 2 8

```
gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa    60
auugguuuua gcauugccu                                            80
```

これらのRNAのうち配列番号25、26、28に示すRNAのGST-RBDとのKd値はそれぞれ次のとおりであった。

配列 2 5 の RNA : 124 nM

配列 2 6 の RNA : 295 nM

配列 2 8 の RNA : 176 nM

そして、配列25～28のRNAは全て用量依存的にRasとRaf-1RBDとの結合を阻害した。

配列番号25、27及び28は3'末端の長さが相違するものであることから、配列25の3'側より1塩基ずつ減少し配列28に至るまでの99～81塩基のRNA（90塩基が配列27に相当する）も活性を有することが推測される。

これらの塩基配列からプライマーとして機能している部分を除いた45塩基の配列を配列番号53及び54に示した。

ここに得られた配列 25 ～ 28 の RNA アプタマーは、合成 DNA より転写により得ることが可能でありまた合成して得ることも可能である。

これらの RNA アプタマーは前記の約 60 塩基からなる RNA アプタマーに比べてその結合活性が強く、かつ RNA の塩基数はより少なくなっていることから、より有用な RNA アプタマーであると考えられる。

キナーゼ活性を有しない R a f - 1 変異体や R a f - 1 のキナーゼドメインに結合する抗体が、細胞のシグナル伝達系における R a s や R a f - 1 の役割を研究するために使用されてきた (Kolch, W., et al., (1991) Nature 349, 426-428. ; Kolch, W., et al., (1996) Oncogene 13, 1305-1314.)。

キナーゼ活性を有せずに R a s に結合し得る R a f - 1 変異体は、R a s 依存の R a f - 1 活性を阻害するのみならず、R a s を含む広範囲なシグナル伝達系をブロックする。これは、この変異体が R a f - 1 の結合を阻害するのと同様に、G T P 結合型 R a s の種々の下流のエフェクターへも影響を与えるからである。

同様に、R a f - 1 のキナーゼドメインのエピトープに結合するモノクローナル抗体は、R a f - 1 含む全てのシグナル伝達系を阻害する。これは、R a f - 1 は、G T P 結合型の R a s によって活性化されるのみならず、R a s とは無関係な経路によって活性化されるからである (Kolch, W., et al., (1996) Oncogene 13, 1305-1314.)。

このような観点からみても、本発明の R B D に対する RNA アプタマーは、R a s や R a f - 1 のキナーゼ活性に何等の影響を与えることなく、R a s と R a f - 1 との結合を特異的に阻害できるものであるといえる。

さらに、本発明の RNA アプタマーは細胞内において発現させることが可能であり (Good, P.D., et al., (1997) Gene Ther. 4, 45-54.)、広範囲な分野に適用可能なものである。

このように、本発明の RNA アプタマーは、「R a s の標的蛋白質」、より好ましくは R a f - 1 の R B D を特異的にブロックするものであり、細胞内のシグナル伝達を制御剤又は細胞のシグナル伝達を制御する方法に使用できるのみならず、シグナル伝達系が関与する各種の疾患の治療、予防又は診断の分野への適用

に特に適しているものである。

本発明の核酸分子種を細胞のシグナル伝達系の制御に使用する場合には、本発明の核酸と直接目的とする細胞へ導入してもよいが、これをウイルスなどに組み込んで細胞に導入することもできる。

また、RNAを直接導入するのではなく、DNAの形で導入することもできる。

本発明の核酸分子種を医薬組成物として使用する場合には、これをそのまま非経口投与することもできるが、ウイルスやDNAの形で各種ベクターに組み込んで投与することもできる。これらの投与形態においては、製薬上許容される担体を用いて医薬組成物とすることもできる。

本発明の医薬組成物は、細胞のシグナル伝達系に関与する各種疾患、特に悪性腫瘍や炎症の治療、予防又は診断に有用である。

実施例

以下に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (蛋白質の精製)

グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 並びにRBD (Raf-1の51-131アミノ酸部分) とGSTとの融合タンパク質 (以下、GST-RBDという。) とを、各々大腸菌株BL21、BL21DE3より発現させ、グルタチオン-セファロース4B (アメルシウム ファーマシア バイオテック社製) 及びHQブロス (バーセプティブ) のカラムを用いてクロマトグラフィーにより精製した (Shirouzu.M., et al., J. Biol. Chem., 273, 7737-7742 (1998)) 。

野生型Ha-Ras蛋白は、大腸菌株BL21から得られたものを、DEAE-セファセル、セファデックスG-75及びリソースQFPLC (アメルシウム ファーマシア バイオテック社製) のカラムクロマトグラフィーにて精製した (Shirouzu.M., et al., J. Biol. Chem., 273, 7737-7742 (1998); Shirouzu.M., et al., Oncogene, 7, 475-480 (1992); Ito, Y., et al., Biochemistry, 36, 9109-9119 (1997)) 。

これらの蛋白質の純度は、クマシーブルー及び/又は銀、染色によるSDS-

PAGEで確認した。精製された蛋白は、 -30°C で50%グリセロール中で保存された。

実施例2 (インビトロセレクション)

ランダムな60塩基を含むDNAのプールを調製した。これらのDNAはその両端に5'-GCCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGAGATCAGAAATAAACGCTCAA-3'、及び、5'-TTCGACATGAGGCCCTGCAGGGCG-3'の配列をインビトロでの転写およびPCRによる増幅のために有している。

75°C で3分間加温され、その後氷冷されたこれらのRNA類は、GST-RBD及びグルタチオン-セファロース4Bビーズを含有する結合バッファー(5 mM MgCl_2 含有リン酸緩衝生理食塩水)中で 4°C で1時間インキュベートされた。GST-RBDが結合したRNA類をグルタチオン-セファロースビーズにより回収した。ビーズを洗浄バッファー(20 mM トリス-HCl pH 7.5、5 mM MgCl_2 及び150 mM NaCl)で洗浄し、ビーズ上のRNA類を沸騰水で溶出した。

第1ラウンドから第13ラウンドまではこの手順で行った。但し、GST及び/又はビーズのみに結合しているRNA類を除去するために、GST-RBDとのインキュベーションの前(第3ラウンドから第13ラウンド)及び溶出の後(第7ラウンドから第13ラウンド)に、RNA類をGSTのみを担持しているグルタチオン-セファロースビーズに通した。

溶出物を逆転写し、PCRで増幅した。次のラウンドのRNAプールを、増幅されたcDNAからのインビトロでの転写により調製した。セレクションの第13ラウンド以降は、フィルター結合法により行った。RNAプール(75°C で3分間加温し、室温まで冷却した。)及びGST-RBDを、 37°C で1時間結合バッファー中でインキュベーションした。GST-RBDと結合したRNA類を、ニトロセルロースフィルターに結合させて分離し、RNA類を7M尿素を含むバッファーで溶出した(Hirao, I., et al., Mol. Diversity, (印刷中))。フィルターに結合しているRNA類を除くために、増幅の前にRNA類をフィルターに

通した。

実施例 3 (ニトロセルロース フィルター 結合アッセイ)

[α - 32 P] UTPを用いてT7 RNAポリメラーゼによりインビトロで転写してRNA類を得た。RNA (0.8 μ M) 及びその蛋白質とを、37℃で1時間、50 μ lの結合バッファー中でインキュベートした。その溶液の一部 (50 μ l) をフィルター上に移し、200 μ lの洗浄バッファーで3回洗浄した。

解離定数を決定するために、1.6 nMの5'-末端が[γ - 32 P] ATPでラベルされたRNA及び種々の濃度のGST-RBDとをインキュベートした。フィルター上の放射線量を、富士BAS 2500 バイオイメージングアナライザーを用いて測定した。

実施例 4 (阻害活性)

0.05%トリトンX-100を含有する結合バッファー160 μ l中のGST-RBD 1 μ gを、リン酸緩衝生理食塩水中のグルタチオン-セファロースビーズ懸濁液10 μ lに混合した。混合物を4℃で30分間インキュベートした。軽く遠心分離した後、上澄み液を捨てた。残ったビーズへ、40 ngのRas (このものは、GTP γ S又はGDPで結合化されていることは文献記載のとおりである (Koide, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8683-8686 (1993))。)、及び、160 μ lのRNAを含む結合バッファー溶液が加えられ、4℃で30分間インキュベートした。インキュベーションの後、ビーズを500 μ lの洗浄バッファーで洗浄した。結合した蛋白質をラエムリのバッファー (Laemmli's buffer) を用いた脱結合によりビーズから溶出させ、15%SDS-PAGEに展開した。抗Ras抗体RAS004 (Moodie, S.A., et al., Science, 260, 1658-1661 (1993)) を用いてイミュノプロットし、これをECL免疫検出装置 (アメルシャム ファーマシア バイオテック社製) により視覚化した。

実施例 5 (RNAプールの作成)

5'末端に5'- ggtaa tacga ctcac tatag ggagt ggagg aattc atcga ggcat -3'、
3'末端に5'- catat gcctt agcga cagca agctt ctgc -3'の配列を有するランダム
な45塩基を含む一本鎖DNA (200 pmol、 1.2×10^{14} 分子)を5'-
ggtaa tacga ctcac tatag ggagt ggagg aattc atcg-3'および5'- gcaga agctt g
ctgt cgcta aggc -3'の2本のプライマーを用いてPCRを行い、次いでT7 RNA
Aポリメラーゼで転写し最初のRNAプールとした。

実施例6 (Raf-1 RBDに結合するRNAの選別)

75℃で3分間加温後氷冷したRNAプール3 μ M (1800 pmol) およ
びGST-RBD 1 μ M (600 pmol) を結合バッファー600 μ l中37
℃で1時間インキュベートした。ニトロセルロースフィルターでろ過し、フィル
ターを洗浄バッファー300 μ lで3回洗浄後フィルター上のRNAを7M尿素
を含むバッファーで溶出した。逆転写後PCRを12サイクル行った。

ここで用いた試薬類は次のとおりである。

GST-RBD: RBD (Raf-1の51~131アミノ酸部分) とグルタ
チオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質は文献 (Shirouzu, M., et
al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 7737-7742.) に記載されている。

結合バッファー: 5 mM MgCl₂含有リン酸緩衝生理食塩水。

洗浄バッファー: 20 mM Tris-HCl pH 7.5、5 mM MgCl₂
および150 mM NaCl。

実施例7 (配列番号25および26のRNA)

実施例6の最初のRNAプールよりRaf-1 RBDに結合するRNAの選別、
RNAよりDNAへの逆転写、増幅、DNAよりRNAへの転写を10回繰り返
し配列表の配列番号25および26のRNAを得た。

実施例8 (配列番号27および28のRNA)

配列25のRNAの相補的な配列を有するDNAをプライマー5'- ggtaa tacg
a ctcac tatag ggagt ggagg aattc atcg -3'とプライマー5'- gctgt cgcta aggc

a tatgc taaaa c -3'あるいは5' - aggca tatgc taaaa ccaat ttata ac-3'を用いてPCRにより3'末端側を短くしたDNAを得、これより配列表の配列番号27および28のRNAを得た。

実施例9 (クローニングと配列の決定)

DNAはTOPO TAクローニングキットを用いてクローニングし、自動DNAシーケンサーで配列を決定した。

実施例10 (Kd値の測定)

4 nMの5'末端をラベルしたRNAと50~1,250 nMのGST-RBDを結合バッファー600 μ l中37℃で30分間インキュベートした。ニトロセルロースフィルターでろ過し、フィルター上の放射活性を測定した。Kd値はソフトウェア:カレイダーグラフを用いて計算した(Bell, S.D., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 14309-14314.)。

実施例11 (結合阻害実験)

0.05% トリトン (Triton) X-100を含有する結合バッファー160 μ l中のGST-RBD 20 pmolと10 μ lのグルタチオン-セファロース4Bビーズを含むリン酸バッファー生理食塩水とを混合し4℃で30分間インキュベートした。ビーズを分離し20 pmolのRasおよびRNA (0、20、100、200 pmol)と結合バッファー(5 mM、MgCl₂含有リン酸緩衝生理食塩水)160 μ l中で4℃で30分間インキュベートした。ビーズを洗浄後結合している蛋白質をラエムリのバッファーで溶出させ、SDS-PAGE後、抗Ras抗体RAS004 (Kanai, T., et al., (1987) Jpn. J. Cancer Res. 78, 1314-1318.)を用いてイミュノブロットしECL免疫検出装置で視覚化した。

配列番号25~28のRNAはRNA量に応じRasの量の低下が認められた。

産業上の利用可能性

本発明は、R a f - 1 などの R a s の標的蛋白質に特異的に結合し、さらには R a s との結合を阻害する R N A が得られたことであり、これらの R N A を用いた細胞内のシグナル伝達経路の特異的阻害方法を提供するものである。本発明により、細胞の特定の経路によりシグナル伝達経路を解明することが出来るのみならず、副作用の少ない医薬組成物を提供することが出来る。

請 求 の 範 囲

1. R a s の標的蛋白質に特異的に結合し得る核酸。
2. 核酸がR N Aである請求の範囲第1項に記載の核酸。
3. 核酸が、R a s の標的蛋白質のR a s 結合ドメインに特異的に結合する請求の範囲第1項又は第2項に記載の核酸。
4. R a s の標的蛋白質が、R a f - 1である請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の核酸。
5. R a f - 1のR a s 結合ドメイン (R B D) へ特異的に結合するR N Aである請求の範囲第4項に記載の核酸。
6. R N Aが、配列表の配列番号1～28のいずれかひとつの塩基配列又はそのうちの1個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／若しくは1個以上の塩基が付加されてなる塩基配列を少なくとも含有するR N Aである請求の範囲第2項～第4項のいずれかに記載の核酸。
7. R N Aが、配列表の配列番号1～8、又は配列番号25～28のいずれかひとつの塩基配列又はそのうちの1個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／若しくは1個以上の塩基が付加されてなる塩基配列を少なく含有するR N Aである請求の範囲第6項に記載の核酸。
8. 請求の範囲第6項又は第7項に記載の核酸と相補的な塩基配列を有する核酸。
9. 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の核酸からなる細胞のシグナル伝達の制御剤。
10. 核酸がR N Aである請求の範囲第9項に記載の制御剤。
12. 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の核酸を使用する細胞のシグナル伝達を制御する方法。
13. 核酸がR N Aである請求の範囲第12項に記載の方法。
14. 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の核酸を含有してなる医薬組成物。
15. 癌又は炎症の治療のための請求の範囲第14項に記載の医薬組成物。
16. 種々の塩基配列を有するR N Aのプールから、R a s の標的蛋白質への結

合能を有するRNAをセレクションすることからなる、Rasの標的蛋白質への特異的な結合能を有するRNAを選別する方法。

17. 種々の塩基配列を有するRNAのプールのRNAが、20～300の塩基からなるRNAである請求の範囲第16項に記載の方法。

18. Rasの標的蛋白質が、Raf-1である請求の範囲第16項又は第17項に記載の方法。

補正書の請求の範囲

[2000年1月21日(21.01.00)国際事務局受理:出願当初の請求の範囲1-18は補正された請求の範囲1-18に置き換えられた。(2頁)]

1. R a s の標的蛋白質に特異的に結合し得る核酸。
2. 核酸がR N Aである請求の範囲第1項に記載の核酸。
3. 核酸が、R a s の標的蛋白質のR a s 結合ドメインに特異的に結合する請求の範囲第1項又は第2項に記載の核酸。
4. R a s の標的蛋白質が、R a f - 1である請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の核酸。
5. R a f - 1のR a s 結合ドメイン(R B D)へ特異的に結合するR N Aである請求の範囲第4項に記載の核酸。
6. R N Aが、配列表の配列番号1～28のいずれかひとつの塩基配列又はそのうちの1個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び/若しくは1個以上の塩基が付加されてなる塩基配列を少なくとも含有するR N Aである請求の範囲第2項～第4項のいずれかに記載の核酸。
7. (補正後) R N Aが、配列表の配列番号1～8、又は配列番号25～28のいずれかひとつの塩基配列又はそのうちの1個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び/若しくは1個以上の塩基が付加されてなる塩基配列を少なくとも含有するR N Aである請求の範囲第6項に記載の核酸。
8. 請求の範囲第6項又は第7項に記載の核酸と相補的な塩基配列を有する核酸。
9. 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の核酸からなる細胞のシグナル伝達の制御剤。
10. 核酸がR N Aである請求の範囲第9項に記載の制御剤。
11. (追加) 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の核酸を使用する細胞のシグナル伝達を制御する方法。
12. (補正後) 核酸がR N Aである請求の範囲第11項に記載の方法。
13. (補正後) 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の核酸を含有してなる医薬組成物。
14. (補正後) 癌又は炎症の治療のための請求の範囲第13項に記載の医薬組成物。

15. (補正後) 種々の塩基配列を有するRNAのプールから、Rasの標的蛋白質への結合能を有するRNAをセレクションすることからなる、Rasの標的蛋白質への特異的な結合能を有するRNAを選別する方法。

16. (補正後) 種々の塩基配列を有するRNAのプールのRNAが、20～300の塩基からなるRNAである請求の範囲第15項に記載の方法。

17. (補正後) Rasの標的蛋白質が、Raf-1である請求の範囲第15項又は第16項に記載の方法。

18. (削除)

第 1 図

Starting RNA:
5'-GGGAGUCAGAAUAAACGCUCAA[-60N-]UUCGACAUGAGGCCCCUUCAGGGCG-3'

PCR primer 1:
5'-GCCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGATCAGAATAAACGCTCAA-3'
EcoRI T7 promoter

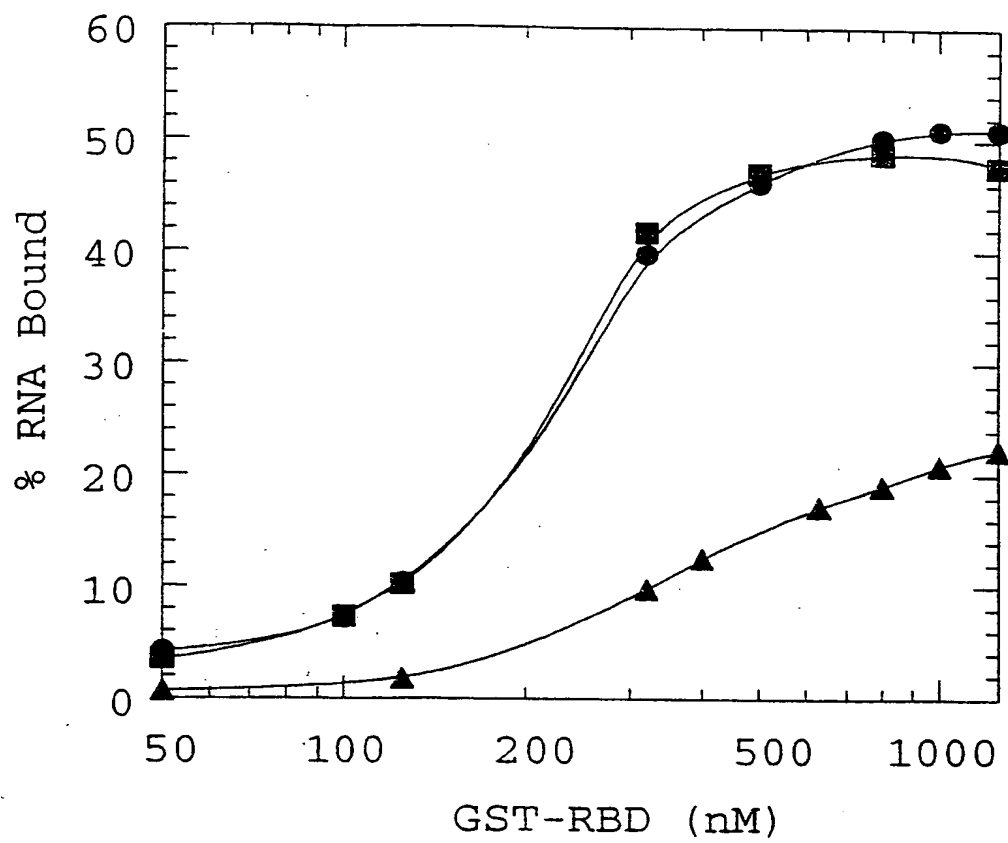
PCR primer 2:
5'-CGCCCTGCAGGGGCTCATGTGCGAA-3'
PstI

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RNA clone ^a	Sequence ^b	RNA Bound (%) ^c
Group 1		
21.01 (6)	CUGAUCAAUGGCGUACAAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUAACCCCUUGGACUGA	42
21.02	CUGAUCAAUGGCGUACAAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUAACCCCUUGGACUGA	
21.03 (4)	CUGAUCAAUGGCGUACAAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUAACCCCUUGGACUGC	
21.04	CUGAUCAAUGGCGUACAAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUAACCCCUUGGACUGC	
21.05	CUGAUCAAUGGCGUACAAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUAACCCCUUGGACUGC	46
21.06	CUGAUCAAUGGCGUACAAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUAACCCCUUGGACUGC	
21.07	UUGACUCAUUGGCGUACAAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUAACCCCUUGGACUG	46
21.08	UUGAAGAUCGUACAAUGGAUUCG--AUCAUAACCCGGAAGUUUUAAACACUCUUAACCCUGA	12
Group 2		
21.09	UCGAGUCCACGAACAUAUAUUUGAACACUUCAGCACCCGGAACAUGCUUAGUACUAUCC	
21.10	UAUUACCAUAGCCUUGAGGUAAACAUAUUUAGCACACCUGAAUAACACGAAACUAUGAACUCA	
21.11 (2)	CUUGAGCCAAUUAAGAUAUUAACAACAAGAACAUGAACGUGACAGCGAUAAUAAUACGA	3
21.12	GCGACAAGCAGCAGAUAAAGUUGAGCGCAACGCCGCUACAGAACCAAAUUAACAUGUAUG	0.2
21.13	UCGAAAGUAAAGUCCGAUACAAACAUAACCUAUUAUUUAGCAGCGAUAAUACAUAUAG	
21.14	GCAGUAAUCCACUUGUAAUUGAAUUGUAGAUGCCAUUAUAGAGUUAUUAUAGUAUCCGAAUUG	
21.15	CGUAGUAGCACACCAGUACCUAUUAUAAUUGCUUCGCAUUGAACCUUAACACAUAAUACAG	
21.16	GAUGACUAAUUAUACAACAGAUAAACCUUACUCUUGAUAAUUGCUUUGCUUUUGGUUAA	1
21.17	UCUUCGAAGUCCAUAGACUGCAAAACCCAGAUAGUCCUUAUCUCAAUUAUCAGUCCCAAGUA	
21.18	ACACUCUAAAUUGUGGUACUAAGGGAGUAAGGGCAACUACGAAGACGUGCAAGGAUAAAG	0.5
21.19	UUUGCCUCGACGGUCUGCGAAUAGAACCGGAACCGUGAUUAGUGUACAAGGAUUCGGUU	
21.20	GUCGCAGCAGAAUAUCAUCGCAAAACCUCAAUUGCAUCUCAUGUAUAUCUAGUCCAA	0.7
21.21	CGAACAUUCUGGAGUAUUAUUAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAA	
21.22	GGGUAAGGGUGAGCAGUUAAGAUUGGUAACUGGCAUUAUUAAGAAAGGUUGGUAGAC	
21.23	GGGUAAGGGUGAGCAGUUAAGAUUGGUAACCGGCAUUAUUAAGAAAGGUUGGUAAAC	1.3
21.24	CUUGGUGUAGUGUUAAGUGAGAUUAUAGUAUAAAGGUUAUUGUUGUGCGAACCG	

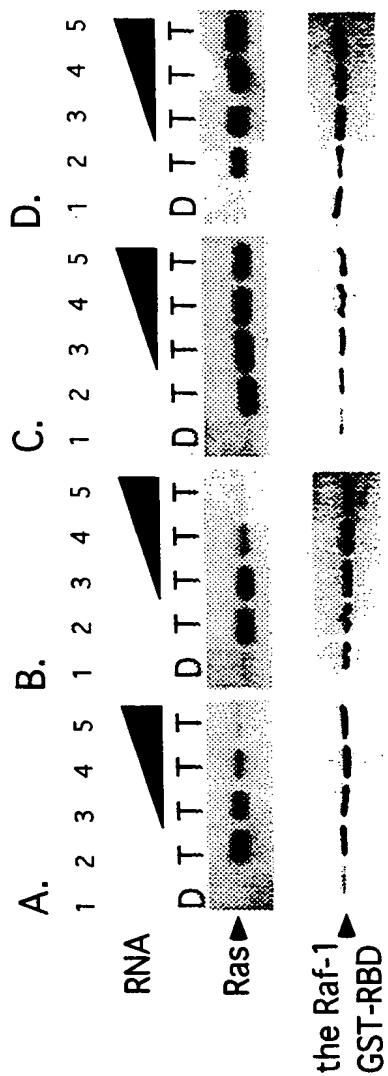
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 3 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 4 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Nucleic acid which may bind specifically to proteins being effectors for Ras

<130> JA900391

<160> 60

<210> 1

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 1

gggagaucag aauaaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucucauaacc 60

aaaaccuuua ccccuuggac ugauucgaca ugaggccccu gcagggcg 108

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 2
<211> 107
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 2

gggagaucag aauaaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucucuaaacc 60

aaaacccuua ccccuaggacu gauucgacau gagggccccug cagggcg 107

<210> 3
<211> 108
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 3

gggagaucag aauaaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucucuaaacc 60

aaaacccuua ccccuaggac ugcuucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 108
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 4

gggagaucag aauaaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgc ucucauaacc 60

aaaacccuua ccccuuggac ugcuucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 5
<211> 108
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 5

gggagaucag aauaaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucucauaacc 60

aaaacccuua cuccuuggac ugcuucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 6
<211> 108

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 6

gggagaucag aaauaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucucuaaacc 60

aaaaccuuu ccccuuggac uguuucgaca ugaggcccuu gcagggcg 108

<210> 7

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 7

gggagaucag aaauaacgcu caauugacuc aauggcguac aauggauucg uucucuaaac 60

caaaaccuu acccuugga cuguucgaca ugaggcccuu gcagggcg 108

<210> 8

<211> 108

<212> RNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 8

gggagaucag aaauaacgcu caauugaaga ucguaacaug gauucgauca uaacccgaag 60

uuuuuaaaca cucuuuaccu guauucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 9

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 9

gggagaucag aaauaacgcu caaucgaguc cacgaacauu acauauuuga acacuucagc 60

accgaacaug cuuaguacua uccuucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 10

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 10

gggagaucag aaauaacgcu caauauuacc auagccuuga gguaaacaau uuagcacacc 60

ugaauacacg aacuaugaac ucauucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 11

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 11

gggagaucag aaauaacgcu caacuugagc caauuaaaag auuuacaaca agaacaugaa 60

cgugacagcg auaauaaauac gauucgacau gagggcccccug cagggcg 107

<210> 12

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 12

gggagaucag aauaaacgcu caagcgacaa gcagcagaua aaguugagcg caacgccgcu 60

acagaaccaa auuaacaugu auguucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 13

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 13

gggagaucag aauaaacgcu caaucgaaag uaaguccgau acaacacaua accuauuauu 60

uagcagcgau aauacaaaua aguucgacau gagggcccug cagggcg 107

<210> 14

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> RNA aptamer

<400> 14

gggagaucag aaauaacgcu caagcaguaa uccacuugua auugaaugua gaugccauau 60

agaguauuaa guaaucgaa uuguucgaca ugaggcccu gcaggcg 108

<210> 15

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 15

gggagaucag aaauaacgcu caacguagua gcacaccaug accuauuaa ucugcuucgc 60

aauguaccuu aacacauaau caguucgaca ugaggcccu gcaggcg 108

<210> 16

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 16

gggagaucag aa metaacgcu caaga augac uaauaa uuac aacagauaac cuuacucuug 60

a metaaugcuu ugcuuuuggu uaauucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 17

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 17

gggagaucag aa metaacgcu caaucuucga aguccaugac ug metaaacca gauaguccua 60

aucucaauua ucagucccaa guauucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 18

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gggagaucag aaauaacgcu caaacacucu aaauuguggu acuaaggag uaagggcaac 60

uacgaagacg ugcaaggaua aaguucgaca ugaggcccu gcagggcg 108

<210> 19

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 19

gggagaucag aaauaacgcu caauugccu cgacggucug cgaauagaac gcgaaccgug 60

auuaguguac aaggauucgg uuuucgacau gagggccug cagggcg 107

<210> 20

<211> 106

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gggagaucag aa metaacgcu caagucgcag cagaaauauc aucgcaaac cucaauugca 60

ucucauguau aucuagucca auucgacaug agggcccguc agggcg 106

<210> 21

<211> 105

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 21

gggagaucag aa metaacgcu caacgaacau cuggaguaau caucuuaaua accucauuua 60

ccuuuacacu uucuaaacua uucgacauga ggccccugca gggcg 105

<210> 22

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 22

gggagaucag aa metaacgcu caaggguaag ggugagcagu ucaagauggu aacuggcauu 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cauuugaaga aagguuggua gacuucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 23

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 23

gggagaucag aaauaacgcu caaggguaag ggugagcagu ucaagauggu aaccggcauu 60

cauuugaaga aagguuggua aacuucgaca ugaggccccc gcagggcg 108

<210> 24

<211> 101

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 24

gggagaucag aaauaacgcu caacuuggug uaguguucaa gugagauaua guauaagguu 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

auuguugugc gaacgguucg acaugaggcc ccugcagggc g

101

<210> 25

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 25

gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa 60

auugguuuua gcauugccu uagcgacagc aagcuucugc 100

<210> 26

<211> 98

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 26

gggaguggag gaauucaucg aggcaugacc ucccguggca guagggguua aaauuauuu 60

ccuacacuuc ucaugccuua gcgacagcaa gcuucugc 98

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 27
<211> 90
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 27

gggaguggag gaauucaucg aggcauangu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa 60

auugguuuua gcauaugccu uagcgacagc 90

<210> 28
<211> 80
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 28

gggaguggag gaauucaucg aggcauangu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa 60

auugguuuua gcauaugccu 80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 29
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 29

cugaucaaug gcguacaaug gauucguucu cauaaccaa acccuuaccc cuuggacuga 60

<210> 30
<211> 59
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 30

cugaucaaug gcguacaaug gauucguucu cauaaccaa acccuuaccc cuggacuga 59

<210> 31
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 31

cugaucaaug gcguaacaug gauucguucu cauaaccaa acccuuaccc cuuggacugc 60

<210> 32

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 32

cugaucaaug gcguaacaug gauucgcucu cauaaccaa acccuuaccc cuuggacugc 60

<210> 33

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 33

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cugaucaaug gcguacaug gauucguucu cauaaccaa acccuuacuc cuuggacugc 60

<210> 34

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 34

cugaucaaug gcguacaug gauucguucu cauaaccaa acccuuacc cuuggacugu 60

<210> 35

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 35

uugacucaau ggcuacaau ggauucguuc ucauaaccaa aaccuuacc ccuuggacug 60

<210> 36

<211> 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 36

uugaagaucg uacaauggau ucgaucuaaa cccgaaguuu uuaaacacuc uuuaccugua 60

<210> 37
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 37

ucgaguccac gaacauuaca uauuugaaca cuucagcacc gaacaugcuu aguacuaucc 60

<210> 38
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 38

uauuaccaua gccuugaggu aaacaauuua gcacaccuga auacacgaac uaugaacuca 60

<210> 39

<211> 59

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 39

cuugagccaa uaaaaagauu uacaacaaga acaugaacgu gacagcgaua auaauacga 59

<210> 40

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 40

gcgacaagca gcagauaaag uugagcgcaa cgccgcuaca gaaccaaaau aacauguaug 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 41
<211> 59
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 41

ucgaaaguaa guccgauaca acacauaacc uauuauuuag cagcgauaau acaaauaag 59

<210> 42
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 42

gcaguaaucc acuuguaauu gaauguagau gccauauaga guuauuagua auccgaauug 60

<210> 43
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 43

cguaguagca caccaugacc uauuaaaucu gcuucgcaau guaccuuaac acauaaucag 60

<210> 44

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 44

gaaugacuaa uaauuacaac agauaaccuu acucuugaua aaugcuuugc uuuugguuaa 60

<210> 45

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 45

ucuucgaagu ccaugacugc aaaaccagau aguccuaauc ucaauuauc gucccaagua 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 46
<211> 60
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 46

acacucuaaa uugugguacu aaggaguaa gggcaacuac gaagacgugc aaggauaaag 60

<210> 47
<211> 59
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 47

uuugccucga cggucugcga auagaacgcg aaccgugauu aguguacaag gauucgguu 59

<210> 48
<211> 58
<212> RNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 48

gucgcagcag aaauaucauc gcaaaaccuc aaugcaucu cauguauauc uaguccaa

58

<210> 49

<211> 57

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 49

cgaacaucug gaguaaucau cuuaauaacc ucauuuaccu uuacacuuuc uaaacua

57

<210> 50

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 50

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggguaagggg gagcaguuca agaugguaac uggcauucan uugaagaaag guugguagac 60

<210> 51

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 51

ggguaagggg gagcaguuca agaugguaac cggcauucan uugaagaaag guugguaaac 60

<210> 52

<211> 53

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 52

cuugguguag uguucaagug agauauagua uaagguuauu guugugcgaa cgg 53

<210> 53

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 45
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 53

augucgacuc cgucuuccuu caaaccaguu auaaaauuggu uuuag

45

<210> 54
<211> 45
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> protein bind
<223> RNA aptamer
<400> 54

gaccucccggu ggcaguaggg guaaaaauua ucuuccuaca cuucu

45

<210> 55
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> prim transcript

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> primer for cDNA

<400> 55

gggagaucag aaauaaacgcu caa

23

<210> 56

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> prim transcript

<223> primer for cDNA

<400> 56

uucgacauga ggccccugca gggcg

25

<210> 57

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer bind

<223> PCR primer

<400> 57

gccggaattc taatacgact cactataggg agatcagaat aaacgctcaa

50

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 58
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> primer bind
<223> PCR primer
<400> 58

cgccctgcag gggcctcatg tcgaa

25

<210> 59
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> primer bind
<223> PCR primer
<400> 59

ggtaatacga ctactatag ggagtggagg aattcatcga ggcat

45

<210> 60
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<221> primer bind

<223> PCR primer

<400> 60

catatgcctt agcgacagca agcttctgc

29

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04399

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N 15/11, A61K 48/00, A61K 31/70, C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N 15/11, A61K 48/00, A61K 31/70, C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Michiko Kimoto et al. "RNA aptamers that specifically bind to the Ras-binding domain of Raf-1", FEBS Letters (Dec.1998), Vol.441, No.2 p.322-326	1-18
A	Walter Kolch et al. "Inhibition of Raf-1 signaling by a monoclonal antibody, which interferes with Raf-1 activation and with Mek substrate binding", Oncogene (1996), Vol.13, No.6 p.1305-1314	1-18
A	Andrew D. Ellington et al. "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", Nature (1990), Vol.346, No.6287 p.818-822	1-18
A	Craig Tuerk et al. "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase", Science (1990), Vol.249, No.4968 p.505-510	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 November, 1999 (12.11.99)

Date of mailing of the international search report
24 November, 1999 (24.11.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/04399

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 15/11, A61K 48/00, A61K 31/70, C12Q 1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 15/11, A61K 48/00, A61K 31/70, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq,
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Michiko Kimoto et al. "RNA aptamers that specifically bind to the Ras-binding domain of Raf-1", FEBS Letters (Dec. 1998), Vol. 441, No. 2 p. 322-326	1-18
A	Walter Kolch et al. "Inhibition of Raf-1 signaling by a monoclonal antibody, which interferes with Raf-1 activation and with Mek substrate binding", Oncogene (1996), Vol. 13, No. 6 p. 1305-1314	1-18
A	Andrew D. Ellington et al. "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", Nature (1990), Vol. 346, No. 6287 p. 818-822	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Craig Tuerk et al. "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase", Science(1990), Vol. 249, No. 4968 p. 505-510	1 - 18